

**МЕХАНИЗМ  
ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО  
ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТА  
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО  
“ОКСИДАТ ТОРФА”.**

Витебский государственный  
медицинский университет,  
Витебская биофабрика.

Проведенные исследования *in vitro* на лимфоцитах цыплят и мышинных фибробластах свидетельствуют, что “Препарат биологически активный оксидат торфа” (ОТ) моделирует действие экзогенного интерферона через систему ферментов, ответственных за синтез 2', 5' - олигоаденилата.

Биогенные стимуляторы обнаружены в иле пресных озер, в торфе, в черноземе и других материалах, содержащих остатки животных и растительных организмов. Они обладают широким диапазоном биологической активности и действуют интегрально на организм человека и животных.

Биогенные стимуляторы растительного происхождения оказывают влияние на организм животного и человека, а биогенные стимуляторы животных действуют на растительные организмы.

В настоящее время разработан научно-техническая документация, включающая ТУ РБ 00483033.001-98 на препарат биологически активный “Оксидат торфа” [9]. Производство данного препарата налажено на Витебской биофабрике.

В его состав входят гуминовые кислоты, фульвокислоты, пурины, аминокислоты, широкая гамма микроэлементов (более 20), полисахариды и другие вещества..

Препараты из торфа обладают широким спектром действия: ускоряют рост животных и птиц [4], оказывают антитоксическое действие [8], повышают пролиферацию клеточных популяций фибробластов млекопитающих [1,10], стимулируют противоопухолевую резистентность животных [6]. Установлено, что препараты из торфа обладают мембранотропным дейст-

вием и позитивно влияют на обменные процессы организма [7,11].

Препарат ОТ применяют как адаптоген, иммуномодулятор, стимулятор роста в ветеринарной медицине и растениеводстве [5]. В бальнеологии ОТ используют для лечения псориаза, нейродермитов, экземы, язв, ран [3].

Целью настоящих исследований явилось изучение чувствительности аденилатциклазы (АЦ), 2',5' — олигоаденилатсинтетазы, фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов (ФДЭ) *in vitro* к препарату ОТ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ОТ предварительно очищали от грубодисперсных частиц специальным методом. В качестве тест - объекта использовали лимфоциты периферической крови цыплят 45-дневного возраста. Лимфоциты выделяли в среде фикола-уротраста [13].

В исследовании использовали лимфоциты с концентрацией клеток  $1 \times 10^6$ . Определение уровня циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), активностей АЦ и ФДЭ проводили стандартным методом.

Принцип метода определения уровня цАМФ заключается в конкурентном связывании немеченного цАМФ и меченного по ( $H^3$ ) белком, который имеет высокую специфичность и сродство к цАМФ. Измерение радиоактивности, связанной с белком, дает возможность вычислить количество немеченного цАМФ в пробе [14].

При изучении динамики изменений уровня цАМФ в лимфоцитах под действием ОТ для сравнения использовали стандартный активатор АЦ—адреналин.

Регистрацию концентрации цАМФ проводили через 1, 5, 10, 20 и 40 минут после контактирования препарата ОТ с клетками.

В основе метода определения активности АЦ клеточных мембран лежит ферментная реакция образования циклического ( $H^3$ ) АМФ из ( $H^3$ ) АТФ.

О степени активности АЦ судили по приросту продукта реакции ц ( $H^3$ ) - АМФ за единицу времени [17].

В основу определения активности ФДЭ положена реакция образования ( $H^3$ ) АМФ из ц( $H^3$ ) АМФ.

Активность ФДЭ оценивали по гидролизу цАМФ в течение 20 минут [15].

Активность 2', 5' — олигоаденилатсинтетазы на культуре клеток мышечных фибробластов определяли по методу Иткеса А.С. [2]. Клетки культивировали в среде Игла с добавлением 8-10%-ной сыворотки крови крупного рогатого скота при температуре 37°C в течение 16 минут.

В первом варианте опыта вносили препарат ОТ в среду выращивания в разведениях  $10^2$  -  $10^4$ , во втором варианте — лейкоцитарный интерферон в концентрации 100 ед/см<sup>3</sup>; контролем служили культивируемые клетки без добавления препарата ОТ. По окончании процесса культивирования клетки снимали со стекла раствором версена, осаждали центрифугированием при 1000 g, переносили в буфер трис-HCL с pH 8,0, содержащий 30 mM KCL, 5 mM MgCL, 1mM дитиотритона, 10% глицерина, 0,05% тритона X-100, измельчали в гомогенизаторе. Полученный гомогенат использовали для определения активности фермента.

Концентрация белка в пробе составляла 3мг/см<sup>3</sup>. В общий объем среды инкубации, равный 100 мкл, вносили  $10^6$  срм ( $H^3$ ) - АТФ. Смесь инкубировали 60 минут при температуре 4°C. Синтезированный олигоаденилат определяли с помощью хроматографии на пластинах И-254 нм в системе растворителя изопропанол - вода. В качестве стандартного метчика использовали олигоаденилат (А)<sub>3</sub>. Хроматографические зоны, соответствующие олигоаденилату, вырезали. Радиоактивность определяли в стинтиллаторе ЖС-8.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Базальный уровень цАМФ в лимфоцитах составлял  $32 \pm 2$  пмоль/ $10^6$  клеток, через 1 мин инкубации с препаратом ОТ разведенным  $1:10^4$  поднимался на 65%, а через 5 мин концентрация цАМФ возрастала на 320%, и на этом уровне сохранялась до 40 мин опыта. В последующие сроки иссле-

дований (40 мин) было зарегистрировано снижение цАМФ в лимфоцитах, обработанных препаратом ОТ.

Адреналин в этих условиях вызывал более быстрое повышение уровня цАМФ (на 600% через 5 мин), а к 10 мин отмечалось резкое падение содержания цАМФ до  $98 \pm 10$  пмоль.

Повышение уровня цАМФ в лимфоцитах под действием оксидата торфа было обусловлено активацией АЦ в 3,3 и 4,8 раза, соответственно, в объемных разведениях  $1:10^3$  и  $1:10^4$ .

Действие препарата ОТ на активность ФДЭ сравнивали с тренталом (1-метил-3 изобутил ксантин), ингибитором ФДЭ.

Было установлено, что препарат ОТ в объемных разведениях  $1:10^2$  -  $1:10^3$  ингибировал ФДЭ на 53-65%. Трентал в концентрациях  $10^{-2}$  -  $10^{-4}$  М ингибировал активность фермента на 34-54%. Таким образом, в ходе эксперимента установлено, что увеличение концентрации цАМФ под действием препарата ОТ происходило также путем ингибирования активности ФДЭ циклических нуклеотидов.

Имеются сообщения, что некоторые препараты (адреналин, биогенные стимуляторы по Филатову и др.) способны индуцировать в клетках антивирусный эффект интерферона [16].

Проявлению этого эффекта предшествует 2-х - 3-х — кратное увеличение уровня цАМФ, а также активация 2', 5' - олигоаденилатсинтетазы и синтеза 2', 5' - олигоаденилата — активатора нуклеаз, специфичных для вирусных м-РНК.

Как известно, повышение активности 2', 5' - олигоаденилатсинтетазы находится в прямой зависимости от устойчивости клеток к вирусу [12].

В таблице помещены данные по сравнительному изучению действия препарата ОТ и лейкоцитарного интерферона на активность 2', 5' - олигоаденилатсинтетазы. Результаты экспериментальных исследований показали, что препарат ОТ, разведенный  $1:10^3$  и  $1:10^4$ , увеличивает активность 2', 5' - олигоаденилатсинтетазы соответственно 1,6 и 2,32 раза, а интерферон — в 5,4 раза.

**Таблица.** Активность 2', 5'- олигоаденилатсинтетазы в клетках при контактировании их с препаратом ОТ и лейкоцитарным интерфероном (n = 5)

Варианты опыта	Разведение препарата	Активность 2', 5'- олигоаденилатсинтетазы	
		пмоль/мг белка в час	%
Препарат ОТ	1:10 <sup>3</sup>	41,6 ± 4,80	160
Препарат ОТ	1:10 <sup>4</sup>	60,32 ± 6,96	232
Интерферон	100 ед/см <sup>3</sup>	140 ± 16,0	540
Контроль	—	26 ± 3,0	100

Проведенные исследования свидетельствуют, что препарат ОТ моделирует действие экзогенного интерферона через систему ферментов, ответственных за синтез 2', 5'- олигоаденилата.

### ВЫВОДЫ:

1. Препарат биологически активный оксидат торфа может моделировать через систему ферментов, ответственных за синтез 2',5'- олигоаденилата, действие экзогенного интерферона.
2. Стимулирующий эффект препарата объясняется сочетанной активацией аденилатциклазы и ингибированием фосфодиэстеразы, что сопровождается увеличением внутриклеточной концентрации цАМФ.
3. Повышение уровня цАМФ приводит к активации 2',5'- олигоаденилатсинтетазы, что указывает на возможную индукцию препаратом ОТ интерфероноподобного эффекта в клетках.

### ЛИТЕРАТУРА:

1. Горовая А.И., Грановский Н.М., Кравцова Л.В., Беньковская Т.Б. Влияние физиологически активных веществ гуминовой природы на функциональную активность растительных, животных и микробных клеток.- В кн.: Тканевая терапия по В.П. Филатову. Одесса, 1977, с. 31-32.
2. Иткес А.В., Кристин Т.И., Шлома Д.В. и др. Индукция эффектов интерферона ингибиторами фосфодиэстеразы с АМР.- Молекулярная генетика, микробиология и вирусология, 1983, с. 39-41.

3. Козин В.М., Кашицкий Э.С. Препарат биологически активный "Оксидат торфа" в лечении псориаза и алергодерматозов. Инструкция на метод.- Витебск, 1999, 6 с.
4. Кузьмин А.Ф., Чалый А.С., Орлова А.В., Лотош Т.Д. Использование гумата натрия в качестве стимулятора продуктивности молодняка крупного рогатого скота.- В кн.: Тканевая терапия по методу В.П. Филатова. Одесса, 1983, т.2, с. 144-145.
5. Наставление по применению препарата биологически активного "Оксидат торфа".- Минск, 1998, 2 с.
6. Наумова Г.В., Косоногова Л.В., Кособокова Р.В. и др. Физиологически активные вещества из торфа и возможности их использования. Одесса, 1983, т.1, с. 23-24.
7. Пирнык В.В., Сангаре М. Влияние комплекса торфа с витамином В<sub>6</sub> на уровень активности трансфераз в условиях экспериментального токсического гепатита. Одесса, 1983, т.1, с. 32-33.
8. Сангаре М., Сотникова Е.П. Антитоксические действия комплекса торфа с пиридоксином при экспериментальном гепатите. Одесса, 1983, т.1, с. 30-32.
9. Технические условия РБ. 00483033.001-98. "Препарат биологически активный "Оксидат торфа".
- 10.Христева Л.А., Кравченко Р.Н., Лотош Т.Д., Реутов В.А. Комплексное использование торфа для совместного получения некоторых физиологически активных веществ.- Одесса, 1983, т.2, с. 210.

- 11.Юрин В.М., Желяева Т.Г., Наумова Г.В., Кособокова Р.В. Электрофизиологический способ тестирования мембранотропного действия физиологически активных соединений.- Одесса, 1983, т.1, с. 24-26.
- 12.Baylioni C., Maroney P.A., West D.K.- Biochemistry, 1979, 18, p. 1765-1770.
- 13.Boyum A. Scand J.- Clin. Lab. Invest, 1968, v.21, Suppl. 97,77.
- 14.Brown B.L., Albano I.D., M., Eruns R.P., Shgherri A.M.- Bioch. J., 1971, 121, p. 561-562.
- 15.Greene H.L., Herman R.H.- Bioch. Med., 1972, 6, p. 19-28.
- 16.Itkes A.V., Jurpaev K.P., Kartasheva O.H. et al.- Molecular and Cellular Biochemistry, 1984, 58, p. 165-171.

- 17.Krishna J.- Pharm. and Exp. Therap., 1968, 163, 2p. 379.

## SUMMARY

V.M.KOZIN, V.V.ZAITSEV

### THE MECHANISM OF PHARMACOLOGICAL ACTION OF BIOLOGICALLY ACTIVE PREPARATION "PEAT OXYDATE" (PO).

The study in vitro on the lymphocytes of chicken and murine fibroblasts has manifested that the biological active "Peat Oxydate" modelates the action of exogenic interferon via the fermental system responsible for the synthesis 2', 5' - oligoadenilate.